บทที่ 2

วัสดุและวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุและเคมีภัณฑ์

2.1.1 เครื่องมือที่ใช้

เครื่องชั่งวิเคราะห์ model H10 TW ของ Metler Instrument, Switzerland

เครื่องอบฆ่าเชื้อแบบไอน้ำความดันสูง model HA-30 ของHirayama, Japan

เครื่องวัด pH model pH 240 ของ Corning, U.S.A.

อ่างน้ำแบบเขย่า (shaking bath) ของ Edman Buhler, Germany

เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (incubator) ของ Heraeus

เครื่องปั่น (Eppendroff centrifuge) model Tomy Mc15-A , U.S.A.

เครื่องปั่นความเร็วสูง model J21-c ของ Beckman Instrument Co.,U.S.A.

เครื่องกาซโครมาโตรกาฟ (gas chromatograph) model 3700 ของ Varian , U.S.A. และ model GC-R1A ของ Shimadzu , Japan

เครื่องกำเนิดกาซไฮโดรเจน (Hydrogen generator) model 15 EHG ของ General Electric co., U.S.A.

เครื่องวัดการดูดแสง (Spectrophotometer) model 2000 ของ Hitachi, Japan

เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส

เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply) model 2197 ของ LKB, U.S.A. และเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าพร้อมเจลขนาดเล็ก model Mupid ของ Maruzen Biochemical Co., Japan

เจลแชมเบอร์ขนาด 12 x 15 นิ้ว model JSC, Thailand

เครื่องกำเนิดแสงอุลตราไวโอเลต (U.V. transilluminator) model TS20 ของ Biorad

ไมโครปิเปต (pipetman) ของ Gilson , France

กล้องถ่ายรูป Pentax super A soft case 3250 , ฟิล์มขาวดำ TriX-pan 400 ที่ตักเจล กล่องพลาสติกย้อมเจล

เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการทำไฮบริไดเซชั่น

กระดาษไนโตรเซลลูโลส (Schlcicher & Schuell # (BA83)

แผ่นพลาสติก lucite หนา 0.5 นิ้ว

เครื่องวัดสารรังสีอนุภาคเบตา (Liquid scintillation counter) model Packcard PL Tri - carb , U.S.A.

เครื่องปิดผนึกถุงพลาสติก (Seal master) , Thailand

เครื่องวัดสารรังสีบริเวณที่ทำการทดลอง (Geiger muller) model SML-2 ของ Technical Associate

อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerate circulating bath)

อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Thermolyne dye bath) model DB17610-26 Thermolyne corporation , U.S.A.

ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator 37-65° ซ) Heraus

เครื่องปั่นแบบตั้งโต๊ะ (Top bench centrifuge) model minor 35 ของ M E, England

กล่องประกบสำหรับทำ autoradiography (cassete) ของ Toshiba ฟิล์ม X-ray (Fuji RX100) น้ำยาล้างฟิล์ม, ไฟสีแดง (safety light)

ตู้แช่แข็ง (Freezer - 70 ° ซ) (Revco)

2.1.2 <u>กาซ</u>

อะเซทิลีนของบริษัทสิทธิโชคเอนจิเนียริ่ง

เอทิลีนมาตรฐานของ supelco

อาร์กอนของบริษัทไทยอินดรัสเตรียลกาซ

อากาศอัดของกรมวิทยาศาสตร์ทหารบก

ไฮโดรเจนจาก Hydrogen generator

2.1.3 <u>เคมีภัณฑ์</u>

2.1.3.1 เรสทริกชันเอนไซม์ EcoRI, BamHI, HindIIIเป็น ผลิตภัณฑ์ของ BRL PstI และ HindIII ที่ใช้ในการทดลองเป็นผลิตภัณฑ์ของ Biolab, Lysozyme (l6878) จากบริษัท Sigma, Pronase 9537088) จากบริษัท Behring diagnostics และ Ribonuclease(R 4875) จากบริษัท sigma

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.3.2 ดีเอนเอมาตรฐาน

ก. ดีเอนเอของฟาจ (ϕ DNA) บริษัท Biolabs

ข. พลาสมิด pSA30 (Canon, F., 1979) มีขนาด 10.7 Kb.เป็น Stringent plasmid มีจีนต้านยาเตตราไซคลิน อยู่ใน E. coli HB101

ค. พลาสมิด pSL 42 (Long , S., 1989) มีขนาด 8.5 kb เป็นพลาสมิดที่มีจีนต้านยาแอมพิซิลินอยู่ใน E. coli

2.1.3.3 ชุดสำหรับการติดฉลาก (Nick Translation Kit) และ สารรังสี (^{32}p-dCTP)

ก. ชุดสำหรับการติดฉลากเป็นผลิตภัณฑ์จาก Dupont รหัส 004 B พอเหมาะกับ 20 ปฏิกิริยาใน 1 ชุด ประกอบด้วย

ข. Nick Translation buffer:Tris HCl 500 มิลลิโมลาร์ pH 7.5, $MgCl_2$ 600 มิลลิโมลาร์, DTT 10 มิลลิโมลาร์, BSA 500 มิลลิกรัม /มิลลิลิตร

ค. Non radioactive dNTP(dATP, dGTP, dTTP อย่างละ 100 มิลลิโมลาร์)

ง. DNase I (0.2 ยูนิต/ไมโครลิตร)

จ. DNA polymerase I (0.6 ยูนิต/ไมโครลิตร)

ฉ. Translation grade water

ช. พลาสมิดควบคุม คือ pBR 322

ซ. Stop buffer (EDTA 250 มิลลิโมลาร์)

ฌ. สารรังสี ^{32}p - dCTP เป็นผลิตภัณฑ์จาก Dupont รหัส 013H มีกัมมันตภาพรังสี 3000 Ci/m Mol (^{32}P - dCTP มีประมาณ 37 MBq) (1 mci)

2.1.3.4 สารเคมีอื่น ๆ

ก. Sephadex G-50 (coarse) บริษัท Phamacia

ข. Bovine serum albumin No.A 7888 RIA grade บริษัท Sigma

ค. Ficoll 400 บริษัท Phamacia

ง. Formamide (47670) บริษัท Fluka

จ. Polyvinyl pyroridone PVP - 40 บริษัท Sigma

ฉ. Calf thymus DNA Type I No. D1501 บริษัท Sigma

หมายเหตุ สารเคมีที่กล่าวมาทั้งหมดนี้เป็นเกรดวิเคราะห์ ส่วนสารเคมีอื่นนอกเหนือจากนี้เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท BDH , Sigma , บริษัท Fluka

2.1.3.5 ชุดน้ำยาล้างฟิล์ม X- ray ประกอบด้วยสารละลาย Fixer และสารละลาย Developer เป็นผลิตภัณฑ์ของ Kodak

หมายเหตุ สารละลาย fixer อายุการใช้ทนนานกว่าสารละลาย developer

2.2 แบคทีเรีย

2.2.1 Bradyrhizobium japonicum ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ สายพันธุ์ต่าง ๆ และแหล่งที่มาแสดงในตารางที่ **4**

2.2.2 Escherichia coli ที่มีพลาสมิด pSA 30 จากห้องปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Escherichia coli ที่มีพลาสมิด pSL 42 จาก Dr. Ann M. Hirsch แผนกชีววิทยา, University of California , Los Angelis U.S.A

2.3 ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.3.1 อาหารสูตร Minimum medium

เป็นอาหารสูตรที่ลดเมือก (suppress exopolysaccharide) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตรประกอบด้วย

Mannitol	10	กรัม
Sodium glutamate	1	กรัม
KH_2PO_4	0.3	กรัม
K_2HPO_4	0.3	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 6.8 ด้วย 1N HCl และเติม อนุมูลโลหะ ประกอบด้วย

$CaCl_2$	0.05	กรัม
$MgSO_4$	0.1	กรัม

Boric acid	10	มิลลิกรัม
$ZnSO_4$	1	มิลลิกรัม
$MnCl_2$	0.5	มิลลิกรัม
Na_2MoO_4	0.1	มิลลิกรัม
$FeCl_3$	1.0	มิลลิกรัม
Biotin	0.2	มิลลิกรัม

2.3.2 อาหารสูตร Yeast mannitol medium (YM) หรือ yeast succinate medium (YS) ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

Na_2HPO_4	0.5	กรัม
D-mannitol	10	กรัม
Yeast extract	0.4	กรัม
NaCl	1.0	กรัม

ปรับ pH เป็น 6.8 ด้วย 1N HCl

เติม $MgSO_4$ 0.2 กรัม

ใช้ 0.0025% Congo red เป็นตัวชี้นำ

2.3.3 อาหารสูตร Tryptone yeast extract (TY) (Beringer, 1974) ในสารอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Tryptone	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.1	กรัม

2.3.4 อาหารสูตร Lauri Bertini (LB)

ในสารอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	5	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7.0 โดยใช้ 1 N HCl

2.3.5 สารอาหารเหลวที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนสำหรับพืช (Jensen, 1942) ในหนึ่งลิตรประกอบด้วย

ก.	KH_2PO_4	34	กรัม
ข.	$MgSO_4.7H_2O$	123	กรัม
ค.	K_2SO_4	65	กรัม
ง.	$FeCl_3$ $6H_2O$	1.4	กรัม
	EDTA	1.7	กรัม
	KCl	0.75	กรัม
จ.	H_3BO_3	124	มิลลิกรัม
	$MnSO_4H_2O$	67	มิลลิกรัม
	$ZnSo_47H_2O$	46	มิลลิกรัม
	$CuSO_4.5H_2O$	10	มิลลิกรัม
	$Na_2MoO_2.2H_2O$	2	มิลลิกรัม

เติมสารละลาย (ก.-จ.) อย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 1 ลิตร และเติมผงแคลเซียมซัลเฟต 0.1 กรัม เมื่อสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว นำไปปรับ pH ให้เป็น 6.5 ด้วยสารละลาย KOH 1 M

<u>หมายเหตุ</u>

สูตรอาหารที่ใช้ในงานวิจัยนี้ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ.ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

ตารางที่ 4 แสดงสายพันธุ์ของ B. japonicum และแหล่งที่มา

สายพันธุ์	แหล่งที่มา
TAL 102	U.S.A. Florida
TAL 377	U.S.A. Missisipi
TAL 432	Brazil
TAL 944	U.S.A.
USDA 8-0, USDA 8-t	U.S.A. Beltsville
THA 1, THA 2, THA 5, THA 6	Thailand BNFRC
USDA6, USDA 24	U.S.A. Beltsville 1973
USDA31, USDA35	U.S.A. 1984
USDA38	U.S.A. Beltsville 1973
USDA76, USDA94	U.S.A. 1984
USDA117, USDA122	U.S.A. Beltsville 1973
USDA136	U.S.A. Beltsville 1981
USDA142	U.S.A. 1984
USDA143	U.S.A. Beltsville 1981
USDA184	U.S.A. 1984

2.4 การเก็บรักษาสายพันธุ์แบคทีเรีย

2.4.1 การเก็บระยะสั้น สำหรับไรโซเบียม จะเก็บในจานอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YM เก็บที่ 4 °ซ เป็นเวลาหนึ่งเดือน และจะ subculture ทุก 1 เดือน ส่วน E. coli เก็บในจานอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB ในกรณีที่มีพลาสมิด pSA30 ก็จะเสริมด้วยเตตระซัยคลิน 12.5 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ในกรณีที่มีพลาสมิด pSL42 ก็จะเสริมด้วยแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.4.2 การเก็บระยะยาว เก็บโดยผสมอาหารเลี้ยงเชื้อ ลงกับกลีเซอรอลในอัตราส่วน 1:1 ที่ -20 °ซ เป็นเวลา 6 เดือน

2.5 การศึกษาทางสัณฐานวิทยา

2.5.1 การย้อมแกรม (gram stain)

นำเชื้อที่เจริญใน YM ระยะ log phase หยดลงบนสไลด์ 1 หยด ปล่อยให้แห้งแล้วตรึงโดยผ่านเปลวไฟไปมา 3 ครั้ง ทิ้งไว้ให้เย็น หยด crystal violet 1% ให้ทั่วบริเวณที่ตรึงแบคทีเรียไว้ปล่อยทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำประปาแล้วหยดสารละลาย Gram's iodine ให้ท่วมบริเวณดังกล่าวปล่อยไว้อีก 1 นาที เทสารละลาย Gram's iodine ออกแล้วล้างทันทีด้วยเอธานอล 95% ล้างต่อด้วยน้ำประปา จากนั้นย้อมทับด้วย safranin O นาน 1 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำประปา ปล่อยให้แห้งแล้วจึงตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า แบคทีเรียที่เป็นแกรมบวก (gram positive) จะติดสีน้ำเงิน ส่วนแบคทีเรียที่เป็นแกรมลบ (gram negative) จะติดสีแดง

2.5.2 การย้อมด้วย carbon fuchsin

นำเชื้อที่เจริญใน YM ระยะ log phase หยดลงบน slide 1 หยด ปล่อยให้แห้ง แล้วเติม Carbon fuchsin ลงไป 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปา ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า เห็นไรโซเบียมติดสีแดง

2.6 การสกัดโครโมโซมอลดีเอนเอ Maniatis,T และคณะ, 1982.,ศิริพร สิทธิประณีต 2531)

เจริญแบคทีเรีย B. japonicum ในอาหารเหลวของ YM 100 มิลลิลิตร โดยใช้ flask ขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง จนเชื้อเจริญถึงระยะ mid log phase ปั่นเก็บเซลล์ ด้วยความเร็ว 4,000xg 20 นาที นำตะกอนมาล้างด้วย SET buffer (sucrose 20 เปอร์เซนต์ (W/V), Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.6,

EDTA 50 มิลลิโมลาร์) นำตะกอนเซลล์ไปแช่ที่อุณหภูมิ -70°ซ นาน 10 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 65°ซ ทันที กระจายเซลล์ใน SET buffer ลงไป 2 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้น ทำให้เซลล์แตกโดยใช้สารละลายไลโซไซม์ (lysozyme 5 มิลลิกรัม ใน TEN บัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร) จำนวน 0.2 มิลลิลิตร และ สารละลาย Rnase (RNase 5 มิลลิกรัม ใน RNase บัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร) จำนวน 0.1 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็งนาน 15 นาที เติม SDS 25 เปอร์เซนต์ จำนวน 0.05 มิลลิลิตร นำไปบ่มและเขย่าเบา ๆ ในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 37 °ซ.นาน 3 - 6 ชั่วโมง เติมสารละลาย Pronase (pronase 2 มิลลิกรัม ใน TEN บัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร) จำนวน 0.3 มิลลิลิตร นาน 10-12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37°ซ เติม phenol (ที่อิ่มตัวใน Tris-HCl 0.1 โมลาร์, pH 8.0 และ Hydroxyquinoline 0.1 เปอร์เซนต์ (w/v) จำนวน 1 เท่าของปริมาตรสารที่ต้องการสกัด กลับหลอดไปมาเบา ๆ 10 ครั้งต่อนาที นำไปปั่นด้วยความเร็ว 4,000g 15 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบน (ชั้นน้ำ) โดยใช้ พลาสเจอร์ปิเปตปากกว้าง นำสารละลายใสส่วนบนมาสกัดอีก 2 ครั้งด้วย Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) จำนวน 1 เท่าของปริมาตรสารที่ต้องการสกัด กลับหลอดไปมา 10 ครั้งต่อนาทีปั่นด้วยความเร็ว 5,000g ดูดสารละลายชั้นบน เติม Sodium acetate 3 โมลาร์ลงไป 1/9 ของปริมาตรสารละลายทั้งหมดกลับหลอดไปมาเติม Isopopanol 60 เปอร์เซนต์ของปริมาตรเดิมนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ 30 นาที ใช้แท่งแก้วพันสายดีเอนเอจุ่มใน Ethanol 70 เปอร์เซนต์ 500 ไมโครลิตร ปั่นด้วยความเร็ว 10,000 g 10 นาที เก็บตะกอนดีเอนเอ ทำให้ตะกอนแห้งโดยอบใน dessicator หลังจากนั้นละลายตะกอนใน TE บัฟเฟอร์ (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, Na_2EDTA 1 มิลลิโมลาร์) เก็บสารละลายดีเอนเอที่อุณหภูมิ 4°ซ

2.7 <u>วิธีวัดปริมาณและทดสอบความบริสุทธิ์ของดีเอนเอ (Maniatis,T.1982)</u>

วิธีวัดปริมาณของสารละลายดีเอนเอ ใช้หลักการวัดการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร โดยใช้ TE บัฟเฟอร์เป็น blank แล้วทียบความเข้มข้นจากค่าดีเอนเอเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จะมีค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่นที่ 260 นาโนเมตร เท่ากับ 1 การวัดอัตราการดูดแสดงที่ความยาวคลื่น 260 เทียบกับ 280 ถ้ามากกว่าหรือเท่ากับ 1.8 ถือว่าดีเอนเอนั้นมีความบริสุทธิ์เหมาะสำหรับการนำไปตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

2.8 การย่อยดีเอนเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

ใช้สารละลายดีเอนที่มีความเข้มข้นจำนวน 3 ไมโครกรัมในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม 3 ไมโครลิตร เติมเรสทริกชันเอนไซม์ 15-20 ยูนิต บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 1-3 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลการตัดดีเอนเอด้วย อะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส

หมายเหตุ บัฟเฟอร์ที่ใช้สำหรับการย่อยดีเอนเอ ขึ้นอยู่กับชนิดของเรสทริกชันเอนไซม์ ถ้าเป็น BamHI และ HindIII ในบัฟเฟอร์ประกอบด้วย (Tris-HCl 100 มิลลิโมลาร์, $MgCl_2$ 100 มิลลิโมลาร์, DTT 10มิลลิโมลาร์, NaCl 500 มิลลิโมลาร์) ถ้าเป็น EcoRI ในบัฟเฟอร์ประกอบด้วย (Tris-HCl 100 มิลลิโมลาร์, $MgCl_2$ 100 มิลลิโมลาร์, DTT 10 มิลลิโมลาร์, NaCl 1000 มิลลิโมลาร์)

2.9 การแยกขนาดของดีเอนเอด้วยอะกาโรสเจล

แยกดีเอนเอออกจากกันตามขนาดและรูปร่างของโมเลกุล โดยทำ อิเลคโตรโฟริซิสของสารละลายดีเอนเอในแผ่นอะกาโรสเจล ที่อยู่ใต้ระดับบัฟเฟอร์ Tris-borate (Tris 89 มิลลิโมลาร์, boric acid 89 มิลลิโมลาร์, EDTA 2.5 มิลลิโมลาร์, pH 8.3) ขนาดของเจลมาตรฐานจะเท่ากับ 100 x 140 x 5 มิลลิเมตร ความเข้มข้นอะกาโรสที่ใช้เป็น 0.7 เปอร์เซนต์ (w/v)) นำดีเอนเอที่ต้องการจะแยกขนาดมาผสมกับ Tracking dye (Ficoll 400 40เปอร์เซนต์ (w/v), EDTA 5 มิลลิโมลาร์ , Bromphenolblue 0.1 เปอร์เซนต์ (w/v) ด้วยอัตราส่วน 10:1 แล้วหยดลงในหลุมช่องเจลทำอิเลคโตรโฟริซิส 20 โวลท์ 16 ชั่วโมง หลังจากการนั้นนำเจลมาย้อมในเอทิเดียมโบรไมด์ 2.5 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร 20 นาที แล้วแช่ล้างในน้ำกลั่น 1 ชั่วโมง แถบดีเอนเอจะปรากฏให้เห็นภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตจากเครื่อง UV - transilluminator บันทึกผลการถ่ายภาพโดยใช้ (Kodak Tri-x ฟิล์ม)

2.10 การสกัดพลาสมิดดีเอนเอ โดยวิธี Rapid alkaline extraction (Brinboim,H. และ Doly, 1979)

เจริญ E. coli ในอาหารเหลว LB จำนวน 100 มิลลิลิตรที่มียาปฏิชีวนะจนถึงระยะ log phase ที่อุณหภูมิ 37°ซ หลังปั่นเก็บเซลล์ 4,000g เติมสารละลายไลโซไซม์ (กลูโคส 50 มิลลิโมลาร์ ,Tris pH-8 25 มิลลิโมลาร์ , EDTA 10 มิลลิโมลาร์, lysozyme 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร; เติมก่อนทำการทดลอง) ลงไป 2 มิลลิลิตร

แช่ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เติม lysis buffer (NaOH 0.2 นอร์มัล , SDS 1เปอร์เซนต์)ลงไป 4 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที เติม sodium acetate ที่มีความเข้มข้น 3 โมลาร์ pH 4.85 ลงไป 3 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็ง 60 นาที ปั่นด้วยความเร็ว 10,000g 20 นาที ดูดส่วนบนขึ้นมาอย่าให้มีส่วนล่างติดขึ้นมา เติม absolute ethanol ที่เย็นลงไป 2 เท่า ของปริมาณสารที่ดูดขึ้นมา ผสมกันให้ทั่ว ตั้งทิ้งไว้ -20 °ซ 1 ชั่วโมง จะเห็นตะกอนสีขาว ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 4,000g 15 นาที ล้างตะกอนพลาสมิดด้วย ethanol 70 เปอร์เซนต์ นำเอาตะกอนพลาสมิดมาทำให้แห้งโดยอบใน dessicator จากนั้นละลายพลาสมิดด้วย TE buffer (Tris HCl 10 มิลลิโมลาร์, EDTA 1 มิลลิโมลาร์) 500-1000 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4° ซ.

2.11 <u>วิธี Southern blot hybridization (Maniatis, T.1982)</u>

วัตถุประสงค์ของการทำ Southern blotting เพื่อถ่ายโอนชิ้นดีเอนเอจากอะกาโรสเจลชิ้นสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส มีหลักการโดยย่อดังนี้ แยกชิ้นดีเอนเอที่ได้หลังจากตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ ตามขนาดโดยการทำอิเลคโตรโฟริซิสบน 0.7 % อะกาโรสเจล จากนั้น ดีเนเจอร์ ชิ้นดีเอนเอบนอะกาโรสเจลให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้ด่าง และทำให้กลับเป็นกลางโดยสารละลายเกลือ จากนั้นถ่ายโอนดีเอนเอจากอะกาโรสเจลไปยังแผ่นไนโตรเซลลูโลส โดยอาศัยแรงผลักของสารละลาย

หลังถ่ายภาพดีเอนเอที่แยกบนอะกาโรสเจลและผ่านการย้อมด้วยเอทิเดียมโบร์ไมด์ แล้วนำเจลไปแช่ใน HCl 0.25 N นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (ถ้าดีเอนเอมีขนาดเล็กสามารถตัดขั้นตอนนี้ได้) หลังล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส 2 ครั้งแล้วจึงดีเนเจอร์ด้วยด่าง(NaOH 0.5 โมลาร์ - NaCl 1.5 โมลาร์) เขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาทีหลังเทสารละลายด่างทิ้งแล้วจึงทำให้ดีเอนเอกลับสู่สภาวะเป็นกลางด้วยสารละลายเกลือ (NaCl 3 โมลาร์ - Tris-HCl 0.5 โมลาร์ pH 7.5) เขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำแผ่นวุ้นวางบนกระดาษกรอง (Whatman 3 MM) ซึ่งวางซ้อนสูงประมาณ 0.5 เซนติเมตร ในกล่องพลาสติก นำแผ่นไนโตรเซลลูโลซที่ชุ่มด้วย 20XSSC (NaCl 3 โมลาร์ - citric acid 0.3 โมลาร์) มาวางบนแผ่นวุ้นไล่ฟองอากาศออกให้หมด โดยใช้ด้านข้างปิเปตกลิ้งไปมา วางแผ่นกระดาษกรองขนาดเดียวกันซ้อนกันสูงประมาณ 2-3 เซนติเมตร แล้ววางทับด้วยกระดาษซับสูงประมาณ 2 - 3 เซนติเมตรใช้บิกเกอร์ใส่น้ำมีน้ำหนัก 500 กรัม วางทับและตั้งทิ้งไว้ตลอดคืน หลังเสร็จการถ่ายโอนดีเอนเอแล้วจึงนำไปตรึงดีเอนเอบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ด้วยการนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสมาล้างด้วย 2XSSC อบที่ 80 °ซ 2 ชั่วโมง เก็บแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ได้ห่อด้วยแผ่น อลูมินัมฟอยล์ เก็บที่ 4°ซ.

2.12 วิธีการ Dot Blot

เป็นการตรึงดีเอนเอตัวอย่างลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสโดยมีหลักการโดยย่อดังนี้ หลังจาก depurination ดีเอนเอด้วยกรดจากนั้นทำดีเอนเอเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้ด่างแล้วทำให้สู่สภาวะเป็นกลางโดยเกลือ นำไปจุดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส

เตรียมดีเอนเอที่มีความเข้มข้น 500 นาโนกรัม ปริมาตร 7 ไมโครลิตร เติม HCl 0.5 โมลาร์ 5 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที เติม NaOH 0.6 โมลาร์ 10 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่ในน้ำแข็งนาน 10 นาที เติมสารละลาย Ammonium acetate 2 โมลาร์ 200 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วแช่ในน้ำเย็นทันที ความเข้มข้นของดีเอนเอตอนนี้จะเป็น 12.5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร หยดดีเอนเอลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (ที่ชุ่มด้วย 20XSSC) ในปริมาตรต่าง ๆ กัน ล้างจุดดีเอนเอด้วย ammonium acetate 1 โมลาร์ ประมาณ 5 - 10 ไมโครลิตร ซับด้วยกระดาษกรองแล้วนำไปอบที่ 80 °ซ เก็บที่ 4°ซ.

2.13 การติดฉลากกัมมันตภาพรังสีดีเอนเอที่ใช้เป็นตัวติดตามโดยวิธี "Nick Translation" (Rigby, 1979 and Maniatis, 1982)

การติดฉลากพลาสมิด pSA30 ซึ่งมีชิ้นส่วนของ nif จีน และ pSL 42 ซึ่งมีชิ้นส่วนของ nod จีน มีหลักการโดยย่อคือ DNase I จะตัดปลาย 3'-hydroxyl ของดีเอนเอและนิวคลีโอไทด์ด้าน 5'-phosphate เกิดรอยขาด (nick) จะย้ายออกไปโดยแอคทิวิตีของ 5'-exonuclease ของเอนไซม์ DNA polymerase ขณะที่นิวคลีโอไทด์ที่มีหมู่ฟอสเฟต 3 หมู่รวมถึง (α^{32}P dCTP) ก็จะถูกสอดเข้าไปแทนที่โดยแอคทิวิตีของ polymerase ในเอนไซม์ DNA polymerase

ในปฏิกริยารวมทั้งหมด 25 ไมโครลิตร มีดีเอนเอจำนวน 500 นาโนกรัม ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5, $MgCl_2$ 10 มิลลิโมลาร์, nuclease-free BSA fraction V, DTT 1 มิลลิโมลาร์, dATP, dGTP, dTTP อย่างละ 20 ไมโครโมลาร์ α^{32}-p dCTP 50 ไมโครคูรี ,DNase I 0.4 ยูนิต และ DNA polymerase 1.2 ยูนิต

นำปฏิกริยารวมทั้งหมดบ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ตรวจสอบปฏิกริยาการเกิด incorporation ของ α^{32}P dCTP ที่เข้าไปแทนที่ในสายดีเอนเอจากเครื่อง - liquid scintillation counter

2.14 วิธีไฮบริไดเซชัน (Maniatis et al,1982)

หลักการเกิดไฮบริไดเซชันมีดังนี้คือ ดีเอนเอเส้นเดี่ยวที่ถูกตรึงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสจะมีการจับคู่กับดีเอนเอตัวติดตาม โดยอาศัยความเป็น complementary ระหว่างคู่เบสของดีเอนเอทั้งสอง ขั้นตอนการทำไฮบริไดซ์จะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน 1. พรี-ไฮบริไดเซชัน เป็นการใช้สารละลายเพื่อป้องกันการเกิด non specific hybridization 2. ไฮบริไดเซชัน เป็นการใส่ตัวติดตามเพื่อให้เกิดการจับคู่ระหว่างเบสคู่สม 3. ขั้นตอนการล้าง ล้างส่วนของดีเอนเอติดตามที่ไม่มีการไฮบริไดซ์ออก

หลังตรึงดีเอนเอลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส แล้วจึงนำมาใส่ถุงพลาสติกเติมสารละลายพรีไฮบริไดเซชัน ใช้ปริมาตรประมาณ 200 ไมโครลิตร/ตารางเซนติเมตรของแผ่นไนโตรเซลลูโลส ปิดปากถุงให้สนิทโดยใช้เครื่องปิดปากถุงพลาสติก นำถุงที่ได้ไปไว้ที่ 42°ซ นาน 12 ชั่วโมง เทสารละลายพรีไฮบริไดเซชัน ทิ้ง เติมสารละลาย ไฮบริไดเซชัน พร้อมกับสารละลายดีเอนเอตัวติดตามที่ติดฉลากด้วย α-P^{32} dCTP (ก่อนเติมจะต้องนำไปต้มที่ 100°ซ) หลังจากนั้นไล่ฟองอากาศออกให้หมด ปิดผนึก ผสมสารในถุงให้ทั่ว นำไปไว้ที่ 42°ซ 24 ชั่วโมง เทสารละลายไฮบริไดเซชันทิ้ง (ถ้าต้องการนำกลับมาใช้ใหม่ เก็บที่ 4°ซ ในหลอดแก้วที่ เคลือบซิลิโคน ก่อนใช้ให้นำมาต้มใหม่อีกครั้ง) นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปล้างในสารละลาย non-stringent ปริมาตรโดยประมาณ 200 มิลลิลิตร 1 ครั้ง เททิ้ง ล้างต่อด้วยสารละลาย stringent ด้วยปริมาตรเท่าเดิมเขย่าที่อุณหภูมิ 65°ซ 30 นาที 2 ครั้งเททิ้งล้างต่อด้วยสารละลาย 0.1xSSC เขย่าที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที 2 ครั้งนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสซับลงบนกระดาษกรอง Whatman 3MM ห่อด้วย saran wrap ก่อนนำไปทำ autoradiography

หมายเหตุ วิธีการเตรียมสารละลายที่ใช้ในการไฮบริไดเซชันอยู่ในภาคผนวก

2.15 การนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสกลับมาใช้ใหม่ (Re-hybridization)

แผ่นไนโตรเซลลูโลสที่เคยใช้ไฮบริไดซ์แล้ว สามารถนำกลับมาใช้ไฮบริไดซ์ครั้งใหม่ได้โดยการกำจัดดีเอนเอติดตามที่เกิดไฮบริดอยู่ออกให้หมด

แช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสในสารละลาย formamide 60 % และ 2X SSC เขย่าที่อุณหภูมิ 70 ° ซ. นาน 2 ชั่วโมง เททิ้งแล้วเติมสาร 2XSSC เขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที 2 ครั้ง นำไปทำ ออโตเรดิโอกราฟฟี เพื่อตรวจดูว่ามีสารรังสีเหลืออยู่หรือไม่ ถ้ามีให้นำกลับไปล้างซ้ำ ตามวิธีที่ได้กล่าวมา

2.16 วิธีพัฒนาภาพ ออโตเรดิโอแกรม

นำแผ่นฟิล์ม X-ray ไปประกบลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ใส่ลงในกล่อง X-ray (cassettes) ซึ่งภายในจะมีแผ่น intensifying screen เก็บไว้ที่ -70°ซ ประมาณ 1-5 วัน ล้างฟิล์ม X-ray ตามวิธีของ Shank และคณะ 1978

2.17 การล้างฟิล์ม X-ray (Shank และคณะ, 1978)

นำแผ่นฟิล์มจาก Cassette มาล้างในสารละลาย Developer (Kodak GBX) 3-5 นาที จุ่มแผ่นฟิล์มลงในน้ำกลั่น แล้วนำมาจุ่มในสารละลาย Fixer (Kodak GBX) 3-5 นาที จุ่มลงในน้ำกลั่นอีกที นำฟิล์มตากให้แห้ง

2.18 การตรวจสอบประสิทธิภาพของ B. japonicum ในการตรึงไนโตรเจนกับพืชตระกูลถั่ว

นำเอาเชื้อ B.japonicum ทดสอบกับถั่วเหลือง (สจ. 5) ปลูกในขวดแบบ Leonard jar (ดัดแปลงจาก Vincent, 1970)

ก. เตรียมขวด Leonard jar นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

ข. นำเมล็ดถั่วเหลือง สจ. 5 มาทำการฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ด (Surface sterilization) โดยแช่ไฮโปรคลอไรด์ 20 เปอร์เซนต์ นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 6 ครั้ง วางลงบน petridish ที่มีสำลีชุ่มน้ำไว้ในที่มืด 1-2 วัน

ค. เพาะเมล็ดถั่วจากข้อ (ข) ลงในขวด Leonard jar หยอดเชื้อไรโซเบียมที่เลี้ยงใน YM ในระยะ late log phase 1 มิลลิลิตรมีเซลล์ 10^8 - 10^9 กลบด้วยทราย และกรวดละเอียด (ที่ฆ่าเชื้อ) นำตัวอย่างทั้งหมดไว้ในเรือนทดลอง (green house) ที่มีระบบควบคุมการผ่านเข้าออกของกระแสลม คอยเติมสารอาหารเหลว (ที่ปราศจากไนโตรเจน) เก็บผลหลังจากปลูก 42 วัน

ง. การเก็บพืชตัวอย่าง ตัดตรงบริเวณรอยต่อระหว่างลำต้นข้อแรกกับราก เก็บส่วนรากใน flask ขนาด 250 c.c. (สลัดทรายออกให้มากที่สุด) ปิดด้วยจุกยางฉีดกาซอะเซทิลีนลงไป 10 c.c. ปมไว้ 1 ชั่วโมง ดูดกาซออกไป 1 c.c. ใส่ในหลอดสูญญากาศนำไปหาค่าแอคติวิตีการรีดิวซ์อะเซทิลีน นับจำนวนปม และชั่งน้ำหนักปมแห้ง, น้ำหนักแห้งของต้นพืช

จ. การวัดแอคติวิตี ของเอนไซม์ไนโตรจิเนสโดยวัดอะเซทิลีนรีดักชัน (acetylene reduction) ฉีดกาซตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เข้าเครื่องกาซโครมาโตร

กราฟ ที่มี detector ชนิด flame ionization ใช้คอลัมน์ porapak N ขนาด 2.0 ม. x 0.5 นิ้ว โดยมีไนโตรเจนชนิดปราศจากออกซิเจน (OFN) เป็นกาซพาด้วยความเร็ว 30 มิลลิเมตรต่อนาทีอุณหภูมิคอลัมน์ 80°ซ อุณหภูมิของ detector 110 °ซ ปริมาณกาซเกิดขึ้นคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟ เปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของเอทีลีนมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอน แอคติวิตีจำเพาะการรีดิวซอะเซทิลีน คือ จำนวนไมโครโมลของอะเซทิลีนที่เกิดขึ้นต่อต้นพืช